© Biologiezentrum Linz/Austria; download unter www.biologiezentrum.at

Stapfia 10	5 — 10	30.11.1982

FLUORESZENZMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN AN B-CHROMOSOMEN VON *ALLIUM FLAVUM* UND *A. PALLENS (LILIACEAE)*

J. Loidl, Wien

MATERIAL UND METHODEN

Pflanzenmaterial und Herkünfte: *Allium flavum* L., Falkenstein, N. Ö.: 2 n = 16 + B, 2 n = 16 + 2B. *Allium* sp., unter dem Namen *A. paniculatum* vom Bot. Garten Coimbra, Portugal als Samen erhalten. Eine Nachbestimmung führte zu *A. pallens* BOISS., jedoch zeigte sich nach der Giemsa C-Bänderungs-Technik ein gänzlich anderes als die von VOSA (1976) für diese beiden Arten beschriebenen Heterochromatinmuster. Ob Bestimmungsprobleme oder echte Variation innerhalb dieser Art (oder Artengruppe?) für diese Diskrepanz verantwortlich sind, ist noch unklar. In der vorliegenden Arbeit wird provisorisch die Bezeichnung *A. pallens* verwendet.

Fluoreszenzfärbemethoden: Für die Fluoreszenzfärbung wurden aus colchizinierten und in Methanol-Eisessig (3 : 1) fixierten Wurzelmeristemen Quetschpräparate hergestellt. Diese wurden nach dem Absprengen des Deckglases nach der Trockeneismethode luftgetrocknet und anschließend gefärbt.

Die Färbung mit Quinacrin-HCl wurde nach SCHWEIZER & NAGL (1976) durchgeführt. Zur Färbung mit Chromomycin A_3 (CMA) und Diamidino-Phenylindol (DAPI) zur sequentiellen Darstellung der komplementären Bänderungsmuster wurde die Methode von SCHWEIZER (1976) angewandt.

Die Fluoreszenzbeobachtungen wurden an einem Mikroskop Leitz Ortholux II mit Auflichtungsfluoreszenzeinrichtung angestellt und mittels einer aufgesetzten Kleinbildkamera festgehalten. Bei gleichzeitig CMA und DAPI gefärbten Objekten konnten durch den Wechsel der Erregerlicht-Filter abwechselnd die spezifischen Fluoreszenzmuster hervorgerufen werden.

Zur Untersuchung von Meiosechromosomen wurden junge Blütenknospen in Methanol-Chloroform-Eisessig (6 : 3 : 2) fixiert, Antheren von passender Größe in einem Tropfen 45% Essigsäure auf einem Objektträger ausgequetscht und die Pollenmutterzellen im Phasenkontrast beobachtet und photographiert.

© Biologiezentrum Linz/Austria; download unter www.biologiezentrum.at

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Bei *Allium pallens* wurde ein B-Chromosom gefunden, welches über eine proximal im langen Arm gelegene Nukleolus-organisierende Region verfügt. Sie unterscheidet sich von der primären Einschnürung durch die positive CMA-Fluoreszenz der angrenzenden Zonen, die dadurch als GC-reich ausgewiesen werden (Abb. 1a). Mit DAPI, einem AT-spezifischen Farbstoff fluoresziert die entsprechende Region gedrückt (Abb. 1b). Auch die NORs an den A-Chromosomen stellen sich in der gleichen Weise dar, allerdings liegen sie nahezu terminal und das angrenzende heterochromatische Material ist nur in kleinen Mengen vorhanden. Bezüglich ihrer Lage in den langen Armen der Chromosomen stellen diese NORs einen eher selten vertretenen Fall dar, noch ungewöhnlicher ist die Lage der NORs proximal in den langen Armen der B-Chromosomen (vergl. LIMA-DE-FARIA 1980). Aus der unterschiedlichen Lage der NORs in A- und B-Chromosomen geht hervor, daß es sich bei den B-Chromosomen dieses Typs um kein unmittelbares Derivat eines A-Chromosoms handelt. Darüberhinaus zeigen sich im Diplotän keine Chiasmata zwischen Standard- und B-Chromosomen. Dagegen sind die in den Pollenmutterzellen — wohl aufgrund einer bei Bs nicht seltenen Zahleninstabilität (vergl. JONES 1975) — in der Zweizahl auftretenden B-Chromosomen zur Chiasmenbildung untereinander befähigt. Gemeinsam bilden sie dann einen Nukleolus, der mit denen der anderen NOR-Chromosomen verschmelzen kann (Abb. 2).

Bei *Allium flavum* aus einer Population in Falkenstein, N.Ö. kommen verschiedene B-Chromosomen-Typen vor (LOIDL 1981, im Druck). Sie unterscheiden sich voneinander in der Größe und in den Schenkelverhältnissen, jedoch wurde gefunden, daß sie Giemsa C-Bänder in ähnlicher Lage besitzen. Wie sich nunmehr durch eine Untersuchung mit Fluoreszenzfarbstoffen herausstellte, können diese Bänder hinsichtlich ihrer Basenzusammensetzung bei den verschiedenen B-Chromosomen-Typen einen Unterschied aufweisen (Abb. 3).

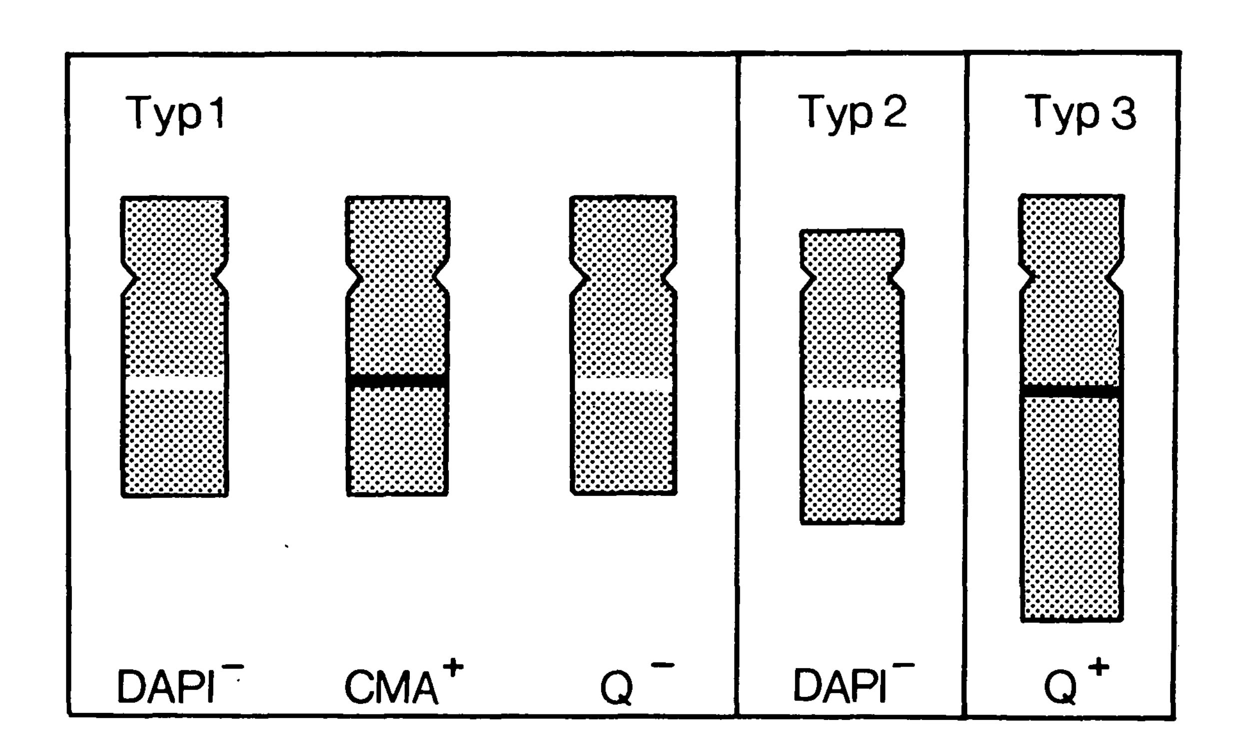


Abb. 3: Schema der Fluoreszenzcharakteristika der Heterochromatin-Bänder in den B-Chromosomen von *Allium flavum*.

© Biologiezentrum Linz/Austria; download unter www.biologiezentrum.at

Typ 1 und 2 unterscheiden sich nur morphologisch. Beide besitzen ein intercalares Band, das sich bei Typ 1 durch DAPI⁻/CMA⁺-Fluoreszenz (Abb. 4a, b) bzw. Q⁻-Fluoreszenz als GC-reich einstufen läßt. Dies gilt auch für Typ 2, wo das Band gedrückt DAPI fluoresziert. Im 3. Typ jedoch zeigt ein an ähnlicher Stelle im Chromosom gelegenes Band Q⁺-Fluoreszenz, was AT-Reichtum vermuten läßt (Abb. 5b). Dieser Unterschied ist auf mehrere Arten erklärbar. So könnten die B-Chromosomen aus einem Chromosom mit Bändern beider Typen durch Deletion der jeweils den anderen Bandtyp einschließenden Bereiche entstanden sein. Ebenso könnten die B-Chromosomen aus Fragmenten eines im proximalen bis medianen Bereich ungebänderten Chromosoms hervorgegangen sein, wobei die unterschiedlichen Heterochromatin-Bänder unabhängig voneinander entstanden sein müßten; und schließlich könnten die betreffenden Bs aus verschiedenen Ausgangschromosomen entstanden sein.

Andere Bänder ließen sich mit basenspezifischen Fluoreszenzfarbstoffen nicht darstellen, obwohl diese B-Chromosomen auch in anderen Bereichen (vorwiegend den terminalen) constitutives Heterochromatin besitzen (LOIDL 1981, im Druck); dieses ist daher wahrscheinlich in der Basenzusammensetzung dem Euchromatin ähnlich.

Danksagung: Herrn Univ.-Doz. Dr. J. GREILHUBER sei für wertvolle Hinweise und kritische Diskussion herzlichst gedankt.

ZUSAMMENFASSUNG

B-Chromosomen von *Allium flavum* und *A. pallens* wurden mit Fluoreszenzmethoden (DAPI, CMA, Q) untersucht. Es zeigten sich in den B-Chromosomen aus einer Population von *A. flavum* zwei unterschiedliche Heterochromatin-Typen an ähnlichen Chromosomenorten. Das B-Chromosom von *A. pallens* besitzt eine proximal im langen Arm liegende SAT-Zone.

ABSTRACT

B-chromosomes of *Allium flavum* and *A. pallens* (provisional det.) were investigated by fluorescent staining methods (DAPI, CMA, Q). In a population of *A. flavum* two different types of B-chromosomes could be discerned in that bands in corresponding locations showed different staining with fluorochromes. The B-chromosome found in *A. pallens* has a nucleolus organizing region which is located proximally in the long arm.

B-Chromosomen, auch akzessorische Chromosomen genannt, können in variabler Anzahl zusätzlich zu den normal vorhandenen Chromosomen auftreten. Hinweise, daß sie proteincodierende Gene tragen, sind spärlich (JACKSON & NEWMARK 1960, zit. bei JONES 1975; RUIZ REJÓN et al. 1980). Vielfach nachgewiesene Effekte auf den Phänotyp werden eher als genisch bedingt betrachtet. Zusätzlich zur Ausstattung des A-Komplements können B-Chromosomen aber sehr wohl über Nukleolus-organisierende Regionen bzw. ribosomale Gene verfügen (BOSEMARK 1957, POWELL & BURTON zit. bei JONES 1975, FLAVELL + RIMPAU 1975, BRANDHAM & BHATTARAI 1977, LOIDL 1981 im Druck). In der vorliegenden Arbeit soll ein B-Chromosom bei *A. pallens*, welches eine Nukleolus-organisierende Region (NOR) besitzt, beschrieben werden.

B-Chromosomen sind meistens kleiner als die zugehörigen Standardchromosomen und unterscheiden sich von diesen meist auch in der Gestalt. Bezüglich des Heterochromatinmusters sind die verschiedensten Typen bekannt. Sie können total hetero-

© Biologiezentrum Linz/Austria; download unter www.biologiezentrum.at

chromatisch bis (nahezu ?) euchromatisch sein und über einen von den A-Chromosomen gänzlich abweichenden oder aber in mancher Hinsicht recht ähnlichen "banding style" (SCHWEIZER & EHRENDORFER 1976, GREILHUBER & SPETA 1976) verfügen. Dies ist bei einer Reihe von B-Chromosomen von *A. flavum* der Fall (LOIDL 1981, im Druck). Wie sich bei diesen das Bänderungsmuster durch die Färbung mit basenspezifischen Fluoreszenzfarbstoffen darstellt, soll in diesem Beitrag erörtert werden.

LITERATURVERZEICHNIS

BOSEMARK, N.O., 1957: Further studies on accessory chromosomes in grasses. — Hereditas **43,** 236—297.

BRANDHAM, P.E., BHATTARAI, S., 1977: The effect of B chromosome number on chiasma frequency within and between individuals of *Gibasis linearis (Commelinaceae).* — Chromosoma (Berl.) **64,** 343—348.

FLAVELL, R.B., RIMPAU, J., 1975: Ribosomal RNA genes and supernumerary B-chromosomes of rye. — Heredity **35,** 127—131.

GREILHUBER, J., SPETA, F., 1976: C-banded karyotypes in the *Scilla hohenackeri* group, *S. persica,* and *Puschkinia (Liliaceae),* — Pl. Syst. Evol. **126,** 149—188.

JONES, R. N., 1975: B-chromosome systems in flowering plants and animal species. — Int. Rev. Cyt. **40,** 1—100.

RUIZ REJÓN, M., POSSE, F., OLIVER, J.L., 1980: The B chromosome system of *Scilla autumnalis (Liliaceae):* Effects at the isozyme level. — Chromosoma (Berl.) **79,** 341—348.

LIMA-DE-FARIA, A., 1980: Classification of genes, rearrangements and chromosomes according to the chromosome field. — Hereditas **93,** 1—46.

LOIDL, J., 1981: B-chromosomes in *Allium flavum (Liliaceae)* and some related species. — Pl. Syst. Evol. (im Druck).

SCHWEIZER, D., 1976: Reverse fluorescent chromosome banding with chromomycin and DAPI. — Chromosoma (Berl.) **58,** 307—324.

— EHRENDORFER, F., 1976: Giemsa banded karyotypes, systematics, and evolution in *Anacyclus (Asteraceae — Anthemideae).* — Pl. Syst. Evol. **126,** 107—148.

— NAGL, W., 1976: Heterochromatin diversity in *Cymbidium* and its relationship to differential DNA replication. — Exp. Cell Res. **98,** 411—423.

VOSA, C. G., 1976: Heterochromatic banding patterns in *Allium.* II. Heterochromatin variation in species of the paniculatum group. — Chromosoma (Berl.) **57,** 119—133.

Anschrift des Verfassers:
Josef Loidl
Institut für Botanik der Universität Wien
Rennweg 14, A-1030 Wien
Austria

© Biologiezentrum Linz/Austria; download unter www.biologiezentrum.at

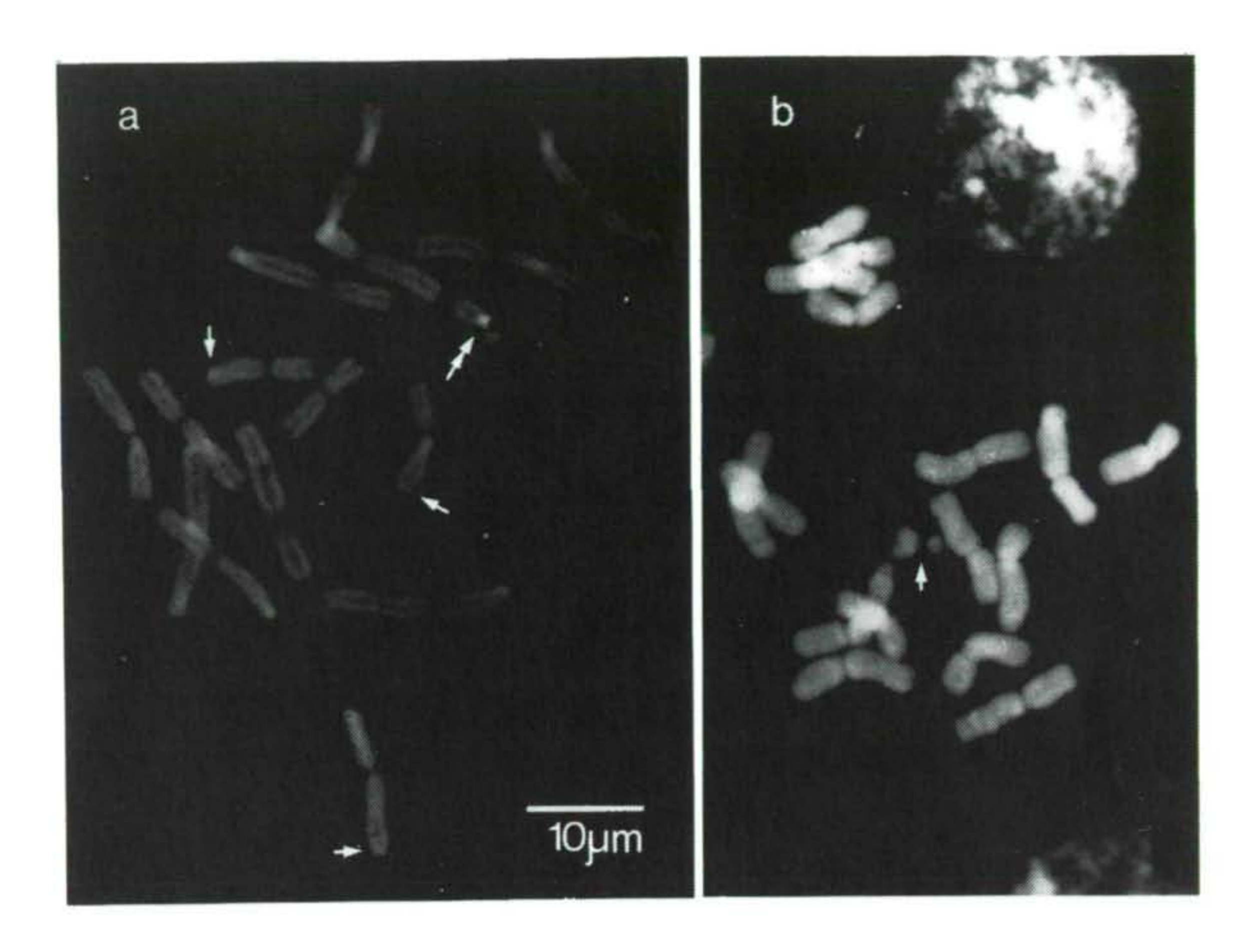


Abb. 1: *Allium pallens.* a. CMA-Fluoreszenz, Bereiche an den NORs fluoreszieren hell, Pfeile: NORs in den Standardchromosomen (inkomplett), Doppelpfeil: NOR im B-Chromosom, b. DAPI-Fluoreszenz; NOR im B fluoresziert gedrückt (Pfeil).

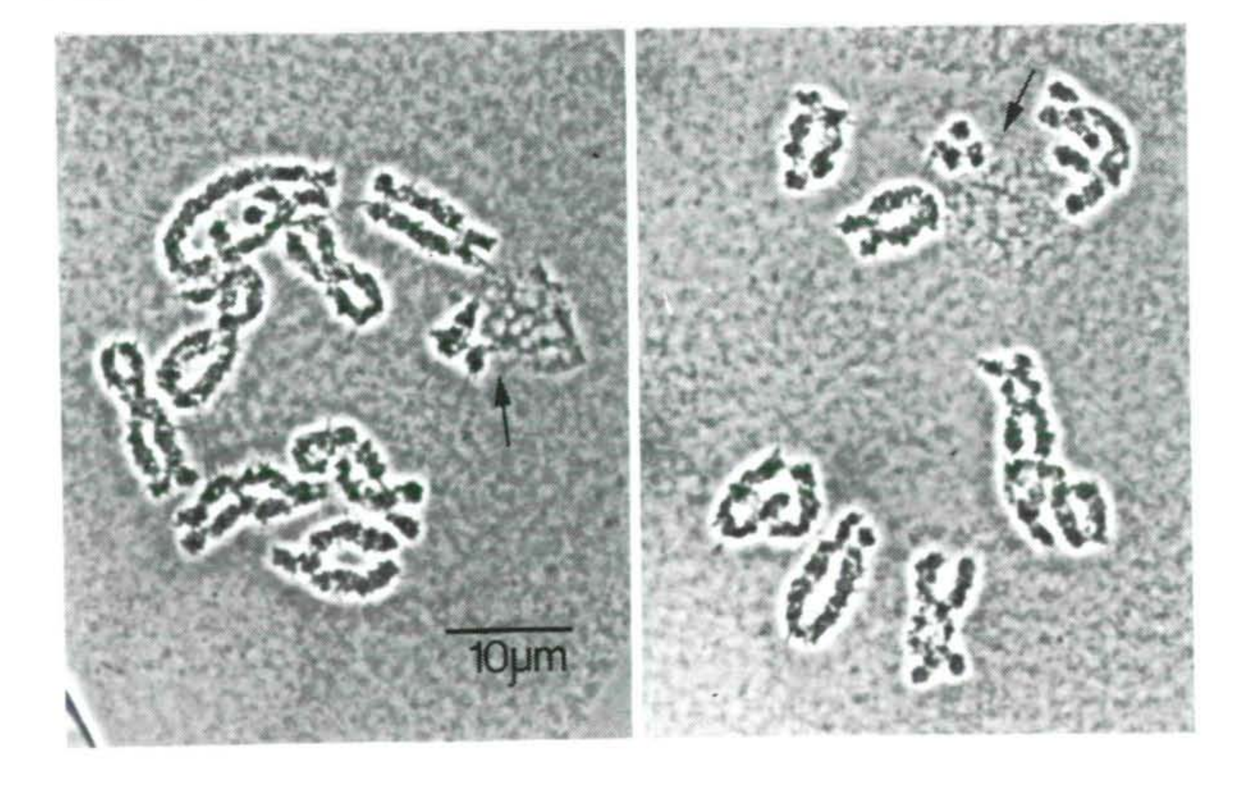


Abb. 2: *Allium pallens,* Diplotän: B-Chromosomen-Bivalent dem Nukleolus assoziiert (Pfeile); Phasenkontrast.

© Biologiezentrum Linz/Austria; download unter www.biologiezentrum.at

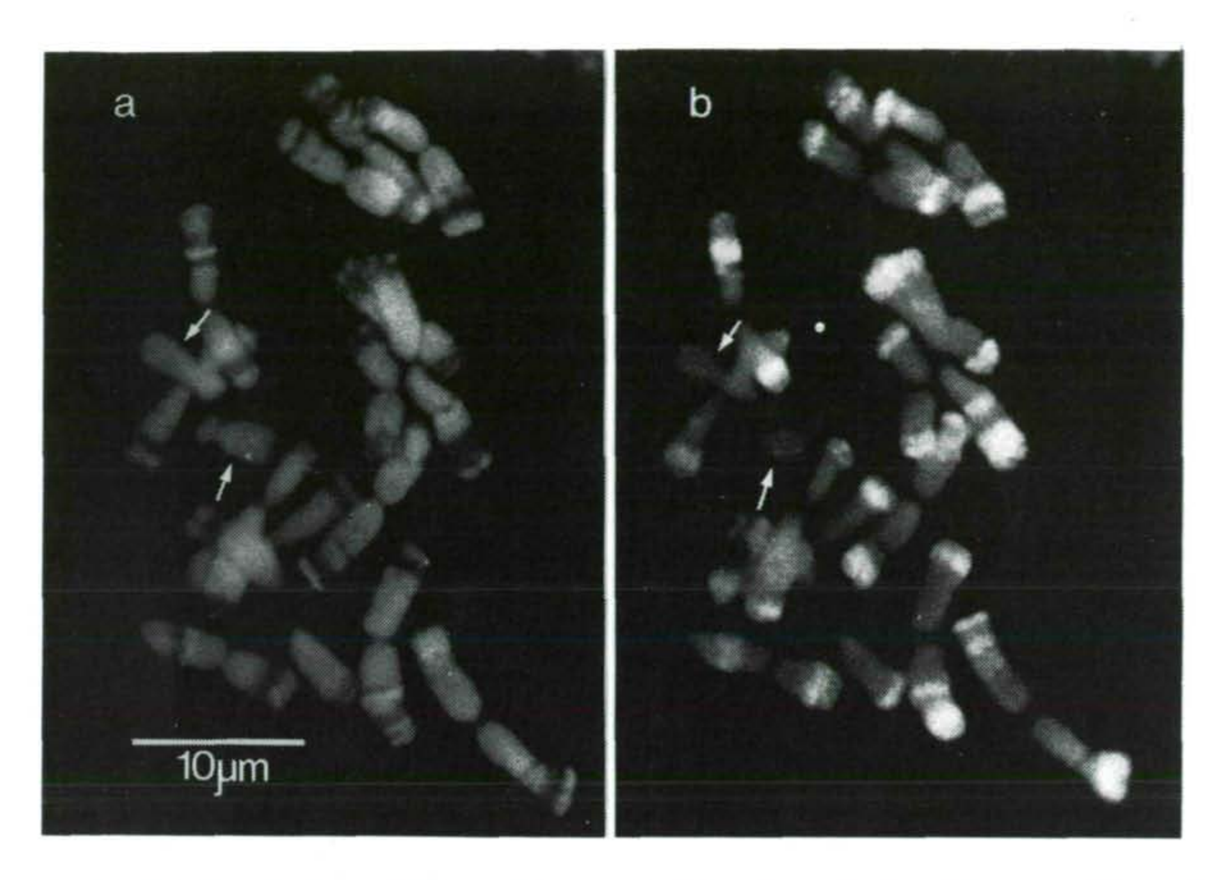


Abb. 4: *Allium flavum*, sequentielle CMA/DAPI-Färbung. a. DAPI-Fluoreszenz: Gedrücktes Band in den B-Chromosomen (Pfeile). b. CMA-Fluoreszenz: Helles Band in den B-Chromosomen.

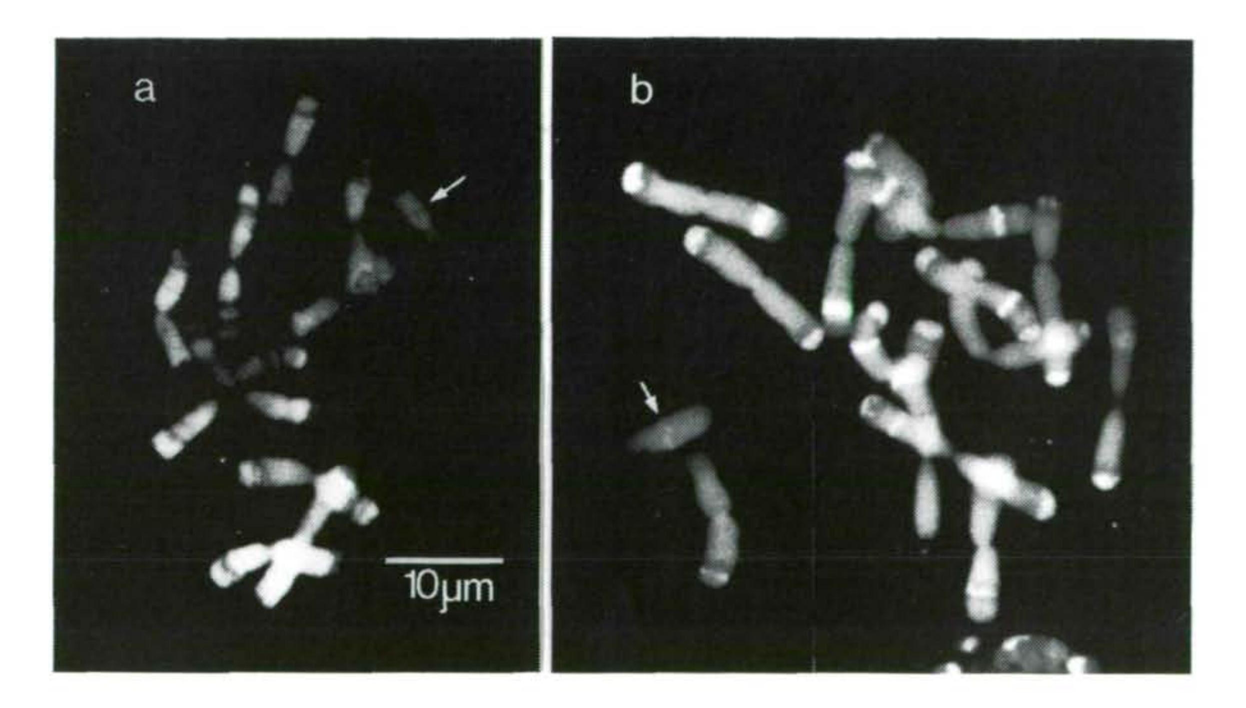


Abb. 5: *Allium flavum*, inkomplette Metaphasen. a. $DAPI^{-}$-Band im B-Chromosom Typ 2 (Pfeil). b. Q^{+}-Band im B-Chromosom Typ 3 (Pfeil).